Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung des Pflanzenkrebses

*

Inaugural-Dissertation,

vorgelegt der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung
der philosophischen Fakultät der Universität Basel
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

von

Georg Walther Schmidt

aus Schleswig (Preussen)

Zürich 1933

Druck: Hans A. Gutzwiller Aktiengesellschaft, Stampfenbachstr. 59, Zürich 6

Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung des Pflanzenkrebses

*

Inaugural-Dissertation,

vorgelegt der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung
der philosophischen Fakultät der Universität Basel
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

von

Georg Walther Schmidt

aus Schleswig (Preussen)

Zürich 1933

Druck: Hans A. Gutzwiller Aktiengesellschaft, Stampfenbachstr. 59, Zürich 6

Genehmigt von der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung der philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. G. *Senn* und Dr. R. *Doerr*.

Basel, den 6. Dezember 1932.

Prof. Dr. A. Buxtorf,
Dekan.

Sonderabdruck aus der Schweiz. Zeitschrift für Hygiene, Heft 2, Jahrg. 1933.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

INHALTSVERZEICHNIS.

Seite

Einleitung 4

I. Morphologie und kulturelles Verhalten des B. t.*) 5

1. Die bisherigen Untersuchungen 5

2. Eigene Versuche 6

A. Herkunft der B. t.-Stämme 6

B. Ansprüche an den Nährboden 6

C. Filtrationsversuche 7

II. Pathogenität und Empfänglichkeit 8

III. Die Infektion 10

1. Die bisherigen Untersuchungen 10

2. Eigene Versuche 11

A. Infektion mitVerlet zung der Pflanzen 11

a) Versuche mit abgestuften Defekten 12

b) Ausschaltung der Wundhormone 12

B. Infektion ohne Verletzung der Pflanzen 14

a) Infektionsversuche an sterilisierten Sämlingen 14

b) Infektionsversuche an älteren Pflanzen 15

IV. Morphologie des Pflanzenkrebses 18

1. Histologischer Bau 18

2. «Tumor strands» 20

3. Vorkommen des B. t. im Pflanzenkrebs 20

4. Wirkungen des B. t. im Pflanzenkrebs 21

V. Transplantation von Pflanzenkrebsen 22

VI. Wesen, Bedeutung und Bekämpfung des Pflanzenkrebses 22

1. Wesen des Pflanzenkrebses 23

2. Einfluss des Tumors auf die Wirtspflanze 23

3. Prophylaxe des Pflanzenkrebses 24

4. Beziehungen zum Krebs des Menschen und der Tiere 24

Zusammenfassung 25

Literaturverzeichnis 26

*) B. t. bedeufet Bacterium tumefaciens.

EINLEITUNG.

Geschwülste werden nicht nur bei Mensch und Tier, sondern auch bei Pflanzen angetroffen; an allen Teilen können sie auftreten. Oft nehmen solche Gebilde Ausmasse an, die man im Vergleich zu ihrer Unterlage kaum für möglich hält. In ebenso weiten Grenzen wie die Grösse kann auch das Aussehen der Geschwülste schwanken, die als leichte Unebenheiten oder als völlig entstellende, höckrige Knoten imponieren können. Beim Studium der an Pflanzen vorkommenden Geschwülste machte man die Feststellung, dass es sich der Ursache und dem morphologischen Aufbau nach um recht verschiedene Gebilde handelt.

So werden der schon längst bekannte Kohlkropf sowie der Kartoffelkrebs durch niedere Pilze resp. Flagellaten, die blasenförmigen Umbildungen an den Blättern von Rhododendron und von Vaccinium Vitis Idaea durch höhere Pilze (Exobasidien) und andere Tumoren endlich, wie die Knollen an den Leguminosenwurzeln, durch Bakterien veranlasst.

Während man aber letztere als für die höhere Pflanze vorteilhafte Symbionten betrachtete, wurden maligne, durch Bakterien erzeugte Geschwülste erst durch die Untersuchungen von *Smith und Townsend* (1907) bekannt. Es gelang diesen Forschern, aus Wucherungen an Chrysanthemum ein Bacterium zu isolieren, das imstande war, Geschwülste zu erzeugen. Wegen dieser Fähigkeit nannten es die Autoren «Bacterium tumefaciens».

Seit den Untersuchungen von *Smith und Townsend* haben sich zahlreiche Forscher mit den Eigenschaften und Wirkungen des B. t.*) beschäftigt. Wiederholt konnte aus den spontan auftretenden Geschwülsten derselben und anderer Pflanzenarten ein identisches Bacterium isoliert werden, so dass schon bald nach der Entdeckung an seiner ätiologischen Bedeutung nicht mehr zu zweifeln war.

Ausser Botanikern und Biologen haben sich auch zahlreiche medizinisch orientierte Bakteriologen und Krebsforscher auf diesem Gebiete betätigt, da die Möglichkeit einer Verwandtschaft der Pflanzenkrebse mit den malignen Tumoren des Menschen nicht a priori von der Hand zu weisen war.

Ausser dem von *Smith und Townsend* zuerst isolierten Bacterium gehören noch eine grosse Anzahl anderer Stämme zu der Gruppe Bacterium (Pseudomonas) tumefaciens, denen die Eigenschaft gemeinsam ist, bei empfänglichen Pflanzen Tumoren zu erzeugen. Um nur die Bezeichnungen der am meisten untersuchten Stämme zu erwähnen, seien ausser dem Originalstamm genannt: Chrysanthemum frutescens II b, PM, Hü, L, T usw. Wenn diese und noch viele andere Bakterien auch zu der gleichen Gruppe gehören, ist damit noch nicht gesagt, dass alle, die morphologisch nicht zu unterscheiden sind, in ihrem kulturellen Verhalten übereinstimmen.

*) B. t. wird als Abkürzung für Bacterium tumefaciens gebraucht.

I. Morphologie und kulturelles Verhalten des B. t.

1. Die bisherigen Untersuchungen.

Das B. t. ist ein recht kleines, 1 bis 3 μ langes und 0,4 bis 0,8 μ breites Stäbchen. Es ist in jungen Kulturen beweglich, besitzt in der Regel an dem einen Ende eine Geissel, manchmal auch mehrere, ist somit in diesen Fällen unipolar lophotrich begeisselt. Sporenbildung wurde bisher nicht beobachtet. In färberischer Beziehung ist B. t. mit den gebräuchlichen Farbstoffen darstellbar, nach Gram verhält es sich negativ. Das Wachstum erfolgt aërob auf allen üblichen Nährböden, wobei auf Gelatine nur kleine, nicht verflüssigende Kolonien entstehen, und aus Zucker kein Gas gebildet wird. Milch kommt unter dem Einfluss des B. t. gewöhnlich nicht zur Gerinnung; zuweilen zeigt sich in späteren Stadien ein bräunlicher Farbton. Lackmusmolke wird nicht angegriffen, aber in den *Barsiekowschen* Zuckerröhrchen wird Rötung beobachtet, was auf Säurebildung hinweist. Gegen Säure im Nährboden, noch mehr aber gegen Alkali sind die Bakterien empfindlich; ebenso gegen Austrocknen und gegen Belichtung. Durch die üblichen Desinfektionsmittel wird B. t. schon in geringen Konzentrationen abgetötet. Die Bakterien wachsen bei Zimmer- und Brutschranktemperatur ungefähr gleich gut; das Optimum liegt etwa bei 32 Grad Celsius. Stärkere Erwärmung vertragen sie schlecht; bei 50 Grad sterben sie schon nach wenigen Minuten ab.

Die bisher beschriebenen Eigenschaften wurden im wesentlichen schon von dem Entdecker *Smith* festgestellt und konnten wenigstens für den Originalstamm auch von anderen Untersuchern bestätigt werden. Systematisch — soweit man davon überhaupt sprechen kann — oder besser gesagt, nach der heute gebräuchlichen Einteilung der Bakterien von *Migula* gehört dieser Keim auf Grund seiner Eigenschaften zu den mono- oder lophotrich begeisselten Bakterien (Genus Pseudomonas Migula), einer Gruppe, aus der das Bacterium pyocyaneum und das Bacterium fluorescens als die wichtigsten Vertreter genannt seien. In neuerer Zeit ist besonders in Amerika anstatt Pseudomonas auch Phytomonas gebräuchlich, ein Ausdruck, der aus Prioritätsgründen ausgemerzt werden muss.

Einige weitere Eigenschaften des B. t. verdienen noch unsere Aufmerksamkeit, wobei gleich bemerkt sei, dass sie noch nicht genügend untersucht und aufgeklärt sind. Es sollen z. B. Individuen vorkommen, die peritrich begeisselt und beweglich sind *(Kauffmann)*, andere wieder sollen unbeweglich sein *(Blumenthal* und *Meyer)*. Mit den R- und S-Formen der Kolonien von B. t. haben sich besonders *Link* und *Hull* beschäftigt. Bei Agglutinationsversuchen fanden diese Autoren, dass die Keime der R-Kolonien leichter flocken, als die der S-Kolonien.

Im serologischen Experiment liessen sich viele Stämme bis zur Titergrenze agglutinieren, was für ihre Identität spricht. Auf die mit dieser Reaktion feststellbaren Unterschiede der an Pflanzen Krebs erzeugenden Bakterien hat besonders *Stapp* in ausgezeichneten Untersuchungen hingewiesen. Ein Teil seiner wertvollen Ergebnisse sei daher hier wörtlich wiedergegeben:

«So ist z. B. der aus Hopfen von *Smith* isolierte Stamm mit keinem der anderen daraufhin geprüften serologisch identisch; sein serologisches Verhalten hat sich auch nicht geändert, nachdem der Stamm in Tomate eingeimpft und aus dem entstandenen Tomaten-Tumor wieder reisoliert war. Der Stamm Chrysanthemum frutescens II b stimmt seinerseits mit mehreren aus Apfelbäumchen, ferner mit einem Stamm aus Wein überein. Der Bakterienstamm aus einem Pfirsich-Tumor ist verschieden von dem aus Stachelbeere, Apfel IV 2 b und Chrysanthemum, stimmt jedoch mit dem Apfelstamm o überein.»

An diese hochinteressanten Fragen sind noch einige Punkte anzuschliessen, die in eigenen Untersuchungen bearbeitet werden konnten.

2. Eigene Versuche.

A. Herkunft der B. t.-Stämme.

Der Originalstamm von *Smith* und *Townsend* (A) wurde uns in dankenswerter Weise vom Institut für Infektionskrankheiten Robert Koch in Berlin zur Verfügung gestellt. Daneben wurden fünf weitere Stämme (B bis F) verwendet, die sämtlich aus experimentell erzeugten Tumoren von Helianthus annuus reisoliert wurden. Sie waren in ihrer Morphologie und in kultureller Hinsicht identisch, unterschieden sich aber in ihrer Wirksamkeit deutlich vom Originalstamm.

B. Ansprüche an den Nährboden.

Zuerst sollen hier die Ansprüche der untersuchten Bakterienstämme an den Nährboden besprochen werden. Auf dem gewöhnlichen Fleischwasser-Pepton-Agar wachsen sie gut und bilden weissliche, runde, etwas erhabene, feuchtglänzende, durchsichtige Kolonien. Auf Schrägagar ist der Belag schleimig, glänzend und nicht durchsichtig.

Interessant war die kulturelle Untersuchung des B. t. auf dem von *Lieske* angegebenen, synthetischen Nährboden, dem verschiedene Vorteile zur Isolierung von B. t. nachgerühmt werden. Er setzt sich folgendermassen zusammen:

Glyzerin	20,0
Kaliumnitrat	5,0
Saures phosphors. Kali .	1,0
Magnesiumsulfat . . .	0,1
Aqua dest. ad	1000,0

Setzt man nach der Angabe von *Lieske* diesem Nährmedium 2 Prozent Agar zu, so erhält man einen festen Nährboden. Das Magnesiumsulfat kann unbeschadet weggelassen werden, aber die anderen Chemikalien sind unbedingt erforderlich, um ein Wachstum des B. t. zu ermöglichen.

Vergleicht man das Gedeihen des B. t. in Nährbouillon mit oder ohne Traubenzuckerzusatz und in dem flüssigen Nährmedium nach *Lieske,* so stellt man fest, dass in der synthetischen Lösung das Wachstum anfangs spärlich ist, auch bei gleicher Temperatur langsamer vor sich geht als in Bouillon. In der wässrig aussehenden Lösung kommt es niemals zu einer homogenen Trübung, sondern es kann unter Umständen einige Tage dauern, ehe am Boden des Glases eine deutliche Flocke zu sehen ist, die dann nach einer weiteren Woche ganz ausserordentlich stark geworden ist. Beim festen Agar-Nährboden nach *Lieske* ist es ganz ähnlich. Auch hier wachsen die Keime nicht sehr schnell, aber im Laufe der Zeit entwickeln sie sich sehr üppig, bilden einen stark schleimigen Belag und färben den Nährboden in weitem Umkreise kräftig braun.

Menschenpathogene Bakterien, wie Strepto- und Pneumokokken, ferner Diphtherie- und Tuberkelbazillen, Bakterien der Typhus- und sogar der Koligruppe wachsen auf dem *Lieske*-Nährboden nicht oder sehr kümmerlich. Auch ein Teil der Saprophyten wird in der Entwicklung gehemmt, während z. B. Bacterium pyocyaneum, das ja der gleichen Gruppe wie B. t. angehört, gut gedeiht. Eine Selektionswirkung ist daher diesem Medium gewiss nicht abzusprechen. Besonders charakteristisch ist für B. t. die bereits erwähnte Braunfärbung.

C. Filtrationsversuche.

Verschiedene Autoren *(Stapp und Bortels, Kauffmann* u. a.) haben bereits versucht, eine Aufschwemmung von B. t. zu filtrieren, um zu untersuchen, ob die Filtrate, die nur noch die Stoffwechselprodukte der Bakterien, aber keine Keime mehr enthalten, auch in der Lage sind, einen Tumor an den Pflanzen zu erzeugen. Alle Experimente in dieser Richtung sind — wie die meinigen — fehlgeschlagen, abgesehen davon, dass *d'Hérelle et Peyre* über positive Resultate berichteten, die sie nach Injektion bakteriophagenhaltiger Filtrate an Rüben erzielten. Neben diesem Punkte galten meine Untersuchungen aber noch anderen Fragen, nämlich

1. ob sich im sogenannten «Entwicklungszyklus» des B. t., der nach den Ausführungen von *Stapp und Bortels* recht kompliziert zu sein scheint, eine ultravisible, bezw. filtrierbare Phase nachweisen lässt und

2. ob die Bakterien infolge ihrer kleinen Dimension gewisse Filter zu passieren vermögen.

Mit diesen so aktuellen Fragen habe ich mich in verschiedenen früheren Arbeiten ausführlich beschäftigt. Besonderes Interesse verdienen ja invisible

Formen bei den menschenpathogenen Krankheitserregern, so das «Ultravirus» der Tuberkulose. In Analogie zu diesen Untersuchungen wurden Versuche in der Art angestellt, dass Kulturen von B. t. nach verschieden langer Wachstumsdauer und von verschiedenen Nährböden in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und durch Chamberlandkerzen (L 1 bis L 5) geschickt wurden. Auch verriebene Pflanzentumoren wurden in gleicher Weise filtriert.

In Uebereinstimmung mit meinen Versuchen an anderen Bakterien ist auch bei B. t. die Ausbeute dieser Versuche ausserordentlich spärlich gewesen. In allen L1- (3) und in einem von drei L1 bis-Filtraten von Kulturaufschwemmungen war nach mehr oder weniger langer Filtrationsdauer B. t. kulturell nachweisbar. Aus Tumorverreibungen und bei Verwendung der Filterkerzen L2, L3 und L5 war aber das Ergebnis stets negativ. Auch diese Versuche widersprechen also der Annahme, dass eine filtrierbare Form des B. t. vorhanden ist.

Gleich bei meinen ersten Versuchen im Jahre 1929 wurden die Helianthus annuus-Pflanzen 11 bis 20 mit L 2-Filtraten von B. t. infiziert. Das Ergebnis war ganz negativ, während die Kontrollen 1 bis 10 regelmässig Tumorbildung aufwiesen. Spätere gelegentliche Filtratverimpfungen auf Pflanzen verliefen ebenso ergebnislos.

II. Pathogenität und Empfänglichkeit.

Bei der Infektion durch B. t. liegen ganz eigenartige Verhältnisse vor, die den sonstigen Erfahrungen der Bakteriologie widersprechen und nur bei Verwendung von zahlreichen Stämmen zu klären sein werden. Schon *Smith* machte in dieser Hinsicht die ersten Feststellungen, aber erst den eingehenden Untersuchungen von *Stapp* ist es zu verdanken, dass ein Einblick in die komplizierten Verhältnisse möglich wurde.

Bestimmte, meist frisch isolierte Stämme von B. t. sind sehr pathogen; nach den Angaben von Stapp verlieren sie aber diese Eigenschaft oft schon nach fünfjähriger Züchtung auf Nährböden. Sehr auffallend ist auch die Erscheinung, dass aus einem Tumor gezüchtete Erreger apathogen sein können. In der ganzen Bakteriologie findet man sonst das Gegenteil: Passage eines Keimes durch den Organismus *steigert* seine Pathogenität. Bei B. t. sind dagegen nicht selten alle aus dem Tumor gewonnenen Subkulturen unwirksam geworden, obwohl ihre Kolonien das gleiche Aussehen haben, und auch serologische Uebereinstimmung besteht.

Auch bei meinen Untersuchungen konnte ich ähnliche Beobachtungen machen. Der Originalstamm war in 100% der Fälle pathogen, aber die Stämme B bis F erzeugten in etwa 25 bis 30% keinen Tumor. Eine Erklärung für diesen Verlust der Pathogenität zu geben, ist schwer. Ich möchte aber hier

— obwohl es nur eine Hypothese sein kann — daran erinnern, dass eine analoge Erscheinung wohl am bekanntesten beim Milzbrandbazillus ist, wenn man diesen bei höheren Temperaturen züchtet (41 bis 42 Grad), wie schon Pasteur feststellen konnte. Man könnte sich vorstellen, dass eine Ueberschreitung der optimalen Temperatur den Verlust der Infektiosität des B. t. verursacht. Diesbezügliche Untersuchungen sind bisher in der Literatur nicht zu finden.

Um den Verlust der Infektiosität des B. t. zu erklären, könnte man auch zu der Hypothese kommen, dass B. t. nur an bestimmte Organismen (z. B. Helianthus, Pelargonium, Chrysanthemum usw.) adaptiert ist und andere (etwa Apfel, Birne, Tiere usw.) nur gelegentlich befallen kann unter Einbusse der pathogenen Eigenschaften. Dieser Annahme widersprechen aber die Erfahrungen, namentlich mit den menschenpathogenen Stämmen.

Der zuerst von *Smith and Townsend* isolierte Stamm, der heute noch in Reinkultur in manchen Laboratorien vorhanden ist, wurde aus Chrysanthemum gewonnen. Später gelang ausserdem die Züchtung aus Spontantumoren von Rebe, Apfel, Birne, Quitte, Rose, Hopfen, Pfirsich, Stachelbeere usw. Unübersehbar gross ist die Zahl der Pflanzen, auf die eine erfolgreiche Uebertragung vorgenommen werden kann. Zum Experimentieren wählte man Arten, die entweder besonders grosse oder schnell wachsende Tumoren erzeugen. Hier sollen nur die wichtigsten genannt werden: Helianthus annuus, Pelargonium zonale, Solanum lycopersicum, Ricinus communis, Beta vulgaris, Daucus carota, Sedum. Von dieser letzten Gattung wurden verschiedene Arten mit Erfolg geimpft, so Sedum spectabile, Telephium, aizoon, album und acre *(Dauvergne)*. Grosse (3.5 cm dicke), fleischige, nicht zerklüftete Tumoren lieferte besonders Sedum spectabile, die Fetthenne. Diese Beispiele sollen genügen, um zu zeigen, wie gross die Anzahl der empfänglichen Pflanzen ist. Sie ist aber nicht unbegrenzt, denn bei einigen Pflanzen konnten *Smith and Quirk* Immunität gegen die Infektion mit B. t. nachweisen.

Bei Tieren ist eine Spontanerkrankung bisher nicht beobachtet worden. Im Experiment gelang es aber *Amormino* bei einer Karausche, sechs Monate nach der Einimpfung des B. t. ein Spindelzellensarkom zu erzeugen. In der Bauchhöhlenflüssigkeit dieses Fisches war das B. t. unverändert nachzuweisen. Diesem einzigen positiven Befunde stehen sehr viele negative an anderen, meistens Laboratoriumstieren (Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten, Mäusen, Hühnern, Tauben, Fröschen) gegenüber. Es seien nur genannt die Versuche von *Borghi e Luzzatto, Scaglioni, Kauffmann* usw.

Trotzdem ist es gelungen, B. t. auch bei Erkrankungen des Menschen zu finden. Bei eitriger Gehirnhautentzündung und Gelenkerkrankung wurde von *Friedemann, Bendix, Hassel und Magnus* ein morphologisch identischer Keim isoliert, der als der Erreger dieser Krankheiten angesprochen wird.

Seit dieser Mitteilung im Jahre 1915 und einer weiteren 1917 sind gleiche oder ähnliche Befunde bei diesen Affektionen nicht wieder erhoben worden.

Im Jahre 1924 teilten dann *Blumenthal, Auler und Meyer* mit, dass es ihnen gelungen sei, aus bösartigen Tumoren des Menschen — Mamma- und Vulvakarzinomen, Wangenkankroid und Oberschenkelsarkom — Mikroorganismen mit allen Eigenschaften des B. t. zu züchten. Es konnten mit diesen Stämmen (PM, Hü, L, Rhode, Be, Ze) an Helianthuskeimlingen Tumoren erzeugt werden. *Lieske* ist auf Grund dieser Befunde und eigener Untersuchungen zum Ergebnis gekommen, dass B. t. der Erreger aller Krebsgeschwülste sei. Die meisten anderen Autoren äussern sich vorsichtiger und glauben, das B. t. könne unter gewissen Bedingungen als auslösendes Agens der Krebsentstehung oder als Vehikel einer anderen causa nocens wirken. Eine Klärung der Verhältnisse war bisher nicht möglich.

III. Die Infektion.

Wie bereits geschildert wurde, genügt zur Infektion einer Pflanze unter Umständen eine sehr geringe Menge (ca. 0,000,001 mg) eines kräftig wirkenden Stammes, z. B. des Originalstammes von *Smith and Townsend*. Ausserordentlich bedeutungsvoll für den Erfolg ist neben dem Objekt namentlich die Art, wie die Bakterien appliziert werden, der Infektionsmodus. Diese Frage ist deshalb so wichtig, weil sie eng mit dem biologischen und morphologischen Geschehen bei der Tumorentstehung in der Pflanze verknüpft ist. Ausserdem haben wir bei der experimentellen Infektion die verschiedenen Bedingungen weitgehend in der Hand, die zu einer Lösung dieses Problems führen können.

1. Die bisherigen Untersuchungen.

Wenn man die vorhandene Literatur durchsieht, um die jeweils angewendete Infektionsart festzustellen, kommt man zu dem Resultat, dass in den meisten Fällen entsprechende Angaben fehlen. Am häufigsten wird der Ausdruck «impfen» ohne nähere Beschreibung gebraucht. Einige Untersucher schildern aber die von ihnen geübten Verfahren; bei diesen lassen sich folgende unterscheiden:

1. *Einschneiden.* Der Vorgang ist dabei der, dass mit einem spitzen Messer ein Schnitt von 1 bis 2 cm gemacht und dieser durch hin- und herbewegen des Messers noch erweitert wird, damit das Impfmaterial eingerieben werden kann.

2. *Ritzen.* Dieses Verfahren ist nur eine etwas mildere Form als das Einschneiden. Es lässt sich mit einer Lanzette bewerkstelligen, auf die man das Infektionsgut aufbringen kann.

3. *Einspritzen.* Die Kanüle einer mit Suspension gefüllten Spritze wird bis zur gewünschten Tiefe in das Pflanzengewebe eingestochen, und dann

durch mehr oder weniger starken Druck an dieser Stelle ein Depot von Bakterien angelegt, deren teilweises Ausfliessen allerdings nicht zu vermeiden ist.

4. *Einstechen.* Eine mit Material versehene Nadel wird in die Pflanze eingestochen; dabei bleibt stets ein Teil des Impfmaterials an der Oberfläche zurück.

Alle diese Inokulationsverfahren stellen für die Pflanze ein Trauma dar. Das ist wichtig, denn ohne Verletzung lebender Zellen scheint eine Infektion unmöglich zu sein. *Stapp* sagt in dem Flugblatt der Biologischen Reichsanstalt. «Es (nämlich das Bakterium) vermag nur durch Wunden (kleine Risse, Frasstellen von Insekten, Schnittwunden und sonstige Verletzungen mechanischer Art) in die Pflanze einzudringen.» Auch nach *Magnus, Blumenthal und Hirschfeld,* sowie *Auler* bedarf es eines energischen Insults, damit die Impfung mit B. t. zur Geschwulstbildung führt. Aus diesen Angaben folgt, dass ohne Trauma ein Tumor offenbar nicht zustande kommt. Die experimentelle Klärung dieser Erfahrungstatsache ist aber bisher nicht versucht worden. Deshalb stellte ich mir die Aufgabe, die Infektiosität des B. t. unter verschiedenen Infektionsbedingungen zu untersuchen.

2. Eigene Versuche.

Meine Versuche, Pflanzen mit B. t. zu infizieren, erstrecken sich über die letzten vier Jahre. Mit wenigen Ausnahmen, in denen junge Exemplare von Pelargonium zonale herangezogen wurden, diente Helianthus annuus als Objekt. Die Zahl der benutzten Pflanzen verteilt sich folgendermassen:

1929	21
1930	120
1931	172
1932	44
zusammen	357

Die Pflanzen wurden nur in seltenen Fällen im Zimmer gehalten; die meisten standen im Garten in Reihen oder kleinen Beeten. Wurden ältere Versuchsobjekte benötigt, so wurde die Aussaat im Gewächshaus des Botanischen Gartens vorgenommen. Im Winter wurden grundsätzlich keine Versuche ausgeführt, weil die Lebensbedingungen der Pflanzen besonders wegen des Mangels an Licht stark beeinträchtigt sind.

A. Infektion mit Verletzung der Pflanzen.

Nach diesen Vorbemerkungen kann die Technik der Infektion besprochen werden. Handelte es sich um die Einimpfung von B. t. oder von Filtraten, so wurde — in der Absicht, günstige Bedingungen zu schaffen — die oben unter 3. angegebene Methode benutzt. Die Kanüle einer mit dem Material gefüllten Rekordspritze wurde in einem Winkel von etwa 45 bis 90 Grad zum Pflanzenstengel nach Belieben weit eingeführt. Es gelang bei stark pathoge-

nen Keimen, z. B. mit dem zur Verfügung stehenden Originalstamm, in 100 % der Fälle — selbst bei fast ausgewachsenen, $1^1/_2$ m hohen Helianthus-Pflanzen — Tumoren zu erhalten. Auch für sehr junge Individuen ist diese Methode brauchbar, wenn man bei ihnen vielleicht auch dem «Einritzen» den Vorzug geben wird. Sehr zuverlässig ist auch das Ein- oder Anschneiden; für jüngere Pflanzen bedeutet aber dieses Verfahren einen unnötig schweren Eingriff.

Dass alle Versuche mit Filtraten negativ ausfielen, ist bereits früher gesagt worden. Um, der Fragestellung folgend, die Möglichkeit der Infektion unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, wurden mehrere Methoden angewendet, die im folgenden besprochen werden sollen.

a. Versuche mit abgestuften Defekten.

Da alle Versuche einer Infektion durch die unverletzte Epidermis ohne Erfolg blieben, wurden an den Stengeln der Pflanzen verschieden schwere Defekte verursacht. Als Instrument diente anfangs (an grösseren Pflanzen) der Fingernagel, später ein kleines, rasiermesserscharfes Werkzeug, das sehr feine Gradunterschiede beim Abschälen der Epidermis und der Rindenzellschichten, namentlich auch bei jungen Exemplaren gestattete. Auf diese künstlich gesetzten Wunden wurden die Bakterien vorsichtig aufgetragen.

Der Ausfall dieser Versuche war anfangs nicht ganz regelmässig; diese Schwankungen der Ergebnisse wurden vielleicht durch das Nachlassen der Pathogenität meiner B. t.-Stämme bedingt. Deshalb wurde diese Versuchsreihe im letzten Jahre wiederholt, wobei aber die Pflanzen im Zimmer gehalten wurden, um die im Freien kaum vermeidbaren, unbeabsichtigten Verletzungen nach Möglichkeit auszuschliessen. Das Ergebnis war an diesen 24 Helianthus-Exemplaren eindeutig und lässt sich folgendermassen zusammenfassen:

Auf die unverletzte Epidermis applizierte Bakterien (ca. 10 mg) erzeugen niemals einen Tumor, bei leichten Epidermisdefekten nur in Ausnahmefällen. Bei mittelschweren (bis in die oberen) und ziemlich schweren (bis in die tieferen Rindenschichten reichenden) Verletzungen kommt es oft zur Tumorbildung, aber nicht regelmässig, wie es bei schweren, bis auf das Cambium gehenden Wunden der Fall ist.

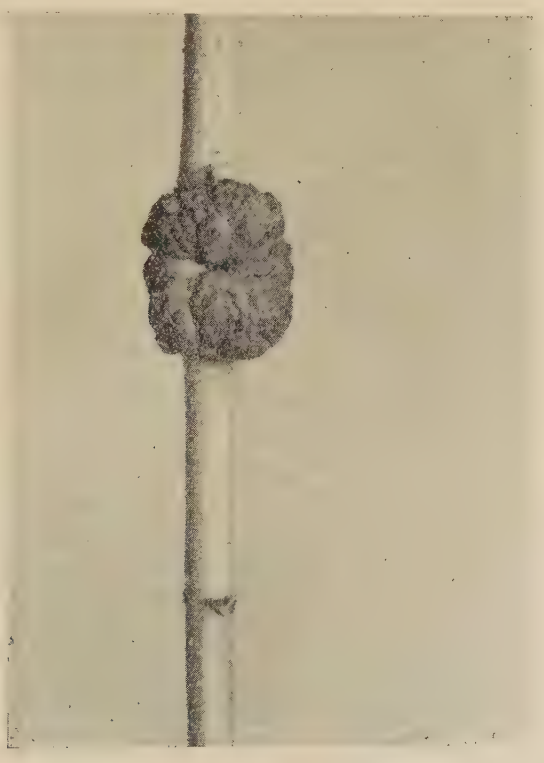
b. Ausschaltung der „Wundhormone".

Es war ferner interessant festzustellen, ob die aus den verletzten Zellen eines Gewebes austretenden Substanzen das Substrat bilden, auf welchem die gleichzeitig mit der Verletzung eingeführten Bakterien sich zu entwickeln vermögen. Dass der Wundreiz, resp. die aus den verletzten Zellen austretenden Substanzen auf das unverletzte Gewebe wirken und z. B. Zellteilungen auszulösen vermögen, ist zuerst von *Wiesner* vermutet worden. Auch *Küster* und *A. Bier* haben für diese Ansicht verschiedene Beobachtungstatsachen geltend gemacht. Der experimentelle Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme

wurde dann von *Haberlandt* in seinen bekannten Versuchen über die «Wundhormone» erbracht; an Kohlrabiknollenscheiben konnte er die stimulierende Wirkung der Zellteilungshormone einwandfrei beweisen, indem unter gründlich ausgewaschenen Wunden keine Zellteilungen auftraten, während dies unter nicht ausgewaschenen der Fall war.

Unter Einhaltung der von *Haberlandt* beschriebenen Technik wurden daher folgende Versuche ausgeführt: An 20 Helianthuspflanzen wurde mit rundem, scharfem Locheisen eine mindestens bis aufs Cambium gehende Verletzung am Stengel gesetzt. Die Wundränder waren allerdings nicht so scharf, wie sie an Rübenschnitten mit dem Messer erzielt werden können. Die verletzten Stellen wurden unter dem Wasserstrahl 15 Minuten lang abgespült und dann vorsichtig mit dem von Traubenzuckernähragar gewonnenen Bakterienrasen geimpft. Als Kontrollen dienten Pflanzen, bei denen das Abwaschen unterblieb, und solche, bei denen keine Bakterien aufgetragen, sondern nur die Verletzungen gesetzt wurden.

Das Ergebnis dieser Versuche war ganz eindeutig, indem von allen sechs Stämmen des B. t. sich an den Pflanzen Tumoren bildeten, gleichgültig ob die Wunde vorher ausgewaschen wurde oder nicht. Die hier beigefügte Photographie gibt einen 7 Wochen alten Tumor am Stengel einer Helianthuspflanze (Nr. 325) wieder, der sich nach Beimpfung der ausgewaschenen Verletzung mit dem B. t.-Stamm A gebildet hatte.



Sieben Wochen alter Tumor am Stengel einer Helianthuspflanze,
der sich nach Beimpfung der ausgewaschenen Verletzung mit dem B. t.-Stamm A bildete

Die unbeimpften Kontrollpflanzen blieben ohne jede Reaktion. In Anbetracht der groben Technik darf aus den Versuchen nur gefolgert werden, dass das Ausspülen der Wunde ohne Einfluss auf die Entstehung des Tumors blieb. Haberlandt selbst sagt, dass es dabei nur gelinge, «die Plasmareste der verletzten Zellen mehr oder weniger vollständig zu entfernen».

B. Infektion ohne Verletzung der Pflanzen.

a. Infektionsversuche an sterilisierten Sämlingen.

Samen von Helianthus annuus wurden durch Spülen in 1 $^{0}/_{00}$ Sublimatlösung während drei bis fünf Minuten äusserlich steril gemacht. Um die letzten Reste des Desinfektionsmittels zu entfernen, wurden die Samen nacheinander in zehn Gefässe mit sterilem Wasser gebracht, wobei sie unter Umschwenken in jedem Behälter etwa eine halbe Stunde blieben. Die ganze Entkeimung dauerte also mehr als fünf Stunden. Nach dieser Zeit war an den Samen keine Veränderung zu erkennen; dann wurden sie steril getrocknet.

a. Versuche auf festen Nährböden.

Der so vorbehandelte Same wurde sofort auf eine Agarplatte gebracht, auf der sich eine 24 bis 48 Stunden alte Kultur von B. t. *Smith and Townsend* entwickelt hatte. Diese Petrischale in dem üblichen Format von 9 cm Durchmesser wurde offen in eine grosse, sterilisierte Kolleschale von 14 cm Durchm. gestellt. Das aus dieser verdunstende Wasser sorgte dafür, dass die beimpften Platten mit den Samen sich in einer «feuchten Kammer» befanden. So blieben die Platten bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehen unter ständiger Kontrolle. Zuweilen bildete sich — wohl als Auswirkung der letzten Spuren des Desinfektionsmittels — um die Samen herum eine sterile Zone aus. Dann wurden die Samen vorsichtig mit stumpfer Pinzette erfasst und an eine andere Stelle gelegt. Meist schon nach drei bis vier Tagen erschien der Keimling und wuchs ziemlich rasch heran, die Wurzelhärchen nach unten in die Kultur von B. t. entsendend. Nach frühestens 10 und spätestens 22 Tagen, wenn bereits eine Länge von 5 cm erreicht war, wurden die Samen in sterilisierte Gartenerde ausgepflanzt. Dort entwickelten sie sich — einzeln in Töpfen — normal und sehr kräftig. Obwohl im ganzen vierzig Samen in der gleichen Weise behandelt wurden, bildete sich niemals ein Tumor, wobei allerdings peinlichst jede Verletzung vermieden wurde; denn zehn Samen, die als Kontrollen dienten und wiederholt leicht angeritzt wurden, liessen schon nach relativ kurzer Zeit den Beginn der Geschwulstentstehung erkennen.

Durch diese Experimente wird eindeutig bewiesen, dass eine Infektion unverletzter Keimlinge selbst dann nicht möglich ist, wenn sie mitten in der hochpathogenen Kultur keimen.

β. Versuche mit Wasserkulturen.

Auch mit einer andern Methode liess sich diese Erscheinung deutlich zeigen. Allerdings lieferte sie nicht so einwandfreie Resultate, wie die eben besprochene.

Die vom Botaniker zu experimentellen Zwecken mit Vorteil verwendete «Wasserkultur» liess sich ohne wesentliche Modifikation anwenden. Reagensgläser wurden entweder mit Bouillon oder mit Nährlösung nach *Lieske* ziemlich hoch gefüllt. In ihr Lumen ragte eine einfache Gazelage etwa bis an den Flüssigkeitsspiegel heran. Nachdem in den Röhrchen kräftiges Wachstum von B. t. eingetreten war, wurde auf die Gazeunterlage der sterilisierte Same gebracht, der sich unter den beschriebenen Bedingungen — Dunkelheit und Zimmertemperatur — gut entwickelte. Nach ein bis drei Wochen wurden die jungen Keime ausgepflanzt, d. h. mit der Lage Gaze in den Boden gebracht.

Bei dieser Serie haben sich unter acht untersuchten Samen an zweien Tumoren entwickelt, was wahrscheinlich auf geringe, fast unvermeidliche Verletzungen zurückzuführen ist. Trotzdem glaube ich, dass diese beiden Fehlresultate nicht imstande sind, die aufgestellte These zu erschüttern, weil beim Ziehen an der Gaze zu leicht Läsionen eintreten können.

Meine Untersuchungen bestätigen also experimentell die Anschauungen von *Stapp,* nach welchen die Infektion und die Tumorbildung nur bei Verletzung möglich ist. Sie widerlegen die allerdings gegenüber der ersten Mitteilung wesentlich eingeschränkte Ansicht von *Israilsky,* die er noch am Ende seiner zweiten Arbeit vertritt, dass nämlich unverletzte Samen (anfangs 20—30 %, später ca. 3 %) und Pflanzen durch blossen Kontakt mit B. t. infiziert werden können.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der mit B. t. in Berührung gebrachten Keimlinge konnten innerhalb des Gewebes Bakterien nicht nachgewiesen werden. Sie scheinen demnach nicht die Fähigkeit zu besitzen, die Zellulosewand der Pflanzen aufzulösen und so in die Zellen und Gewebe einzudringen. Dass bei den mikroskopischen Untersuchungen besondere Vorsicht und Kritik nötig ist, soll später ausgeführt werden.

b. Infektionsversuche an älteren Pflanzen.

Ausser an sterilisierten Samen und Keimlingen wurden die Infektionsverhältnisse an älteren Pflanzen untersucht, wobei sich die etwa 10 bis 25 cm hohen Individuen als die geeignetsten erwiesen.

α. Applikation des Impfmaterials an die Aussenwand der Epidermis.

Bei dem üppigen Wachstum von B. t., namentlich auf traubenzuckerhaltigen Nährböden ist es nicht schwer, grössere Mengen pathogener Keime zu

erhalten. Die zwei- bis dreitägigen Kulturen wurden mit dem Platinspatel (Triangel) von der Platte entnommen, und davon etwa 50 bis 100 mg auf ein kleines sterilisiertes Gummiläppchen gebracht. Dieses wurde dann sofort unter Vermeidung jeder Verletzung um den Stengel der Pflanze gelegt, so dass die Kulturen die feinbehaarte Oberfläche innig berührten. In dieser Lage wurde das Läppchen durch Umwickeln eines breiten Baumwollbandes nicht zu stramm fixiert. Dieses Verfahren wurde an 32 Pflanzen geübt; nach 2, 10, 24, 48 Stunden, an einigen erst nach 50 Tagen, wurde die Umwicklung entfernt. Manchmal war infolge des Dickenwachstums am Stengel eine Einschnürung entstanden. B. t. liess sich bei den vorgenommenen Kontrolluntersuchungen mindestens zehn Tage lang lebensfähig nachweisen; selbst Regen schwemmte es nicht ab, wie zuerst befürchtet wurde. An einzelnen Pflanzen wurde das Auflegen von Kulturen zwei- oder auch dreimal wiederholt. Auf den Ausfall der Versuche blieb auch das ohne Einfluss.

Niemals ist es mit der Methode der blossen Umwicklung gelungen, einen Tumor an den Pflanzen zu erzeugen, obwohl mit der Nadel infizierte Kontrollpflanzen immer typisch erkrankten.

Um die Bedingungen für die Infektion durch die unverletzte Epidermis zu verschärfen, wurde — genau wie beim vorhergehenden Verfahren — zuerst umwickelt, dann aber noch eine Klammer darüber gesetzt, die einen Druck ausübte. Es wurde zu diesen Experimenten Klammern verwendet, wie sie im Laboratorium zur Stillung einer Blutung gebraucht werden. Sie haben den Vorteil, dass man in weiten Grenzen jedes Lumen umspannen kann, und dass der von ihnen erzeugte Druck beliebig reguliert werden kann.

Diese ringförmige, lokale Druckwirkung verursacht am Stengel der Pflanzen keine Verletzung, aber er führt mit der Zeit zu einer Einschnürung und Deformierung des sonst runden Stengels, die sehr hochgradig sein kann. Solche Pflanzen leiden in ihrer Ernährung anscheinend nicht, sind dann aber sehr wenig widerstandsfähig, so dass sie leicht abbrechen.

Auch bei dieser durch den kontinuirlichen Druck verschärften Applikationsform wurde die Entstehung eines Tumors niemals beobachtet, obwohl im ganzen 44 Pflanzen für diese Versuche verwendet wurden.

β. Injektion einer Bakterienaufschwemmung in die Interzellularräume mit Hilfe der Luftpumpe.

Dasselbe Ergebnis wurde auch bei der Anwendung des Injektionsverfahrens erzielt, das *Gicklhorn* im Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden von Abderhalden ausführlich — allerdings für andere Zwecke — dargestellt hat.

Einzeln in Blumentöpfe von 9 cm Durchmesser eingepflanzte Exemplare von Helianthus annuus, die etwa 15 bis 25 cm gross waren, wurden zu den Injektionsversuchen verwendet. In einen 34 cm hohen und 15 cm im Dia-

meter messenden Rezipienten aus Glas wurde ein Dreifuss von 22 cm Höhe gestellt, der ein Stäbedreieck trug, ebenfalls aus Glas. Um die Pflanze wurde eine mit schmalem Schlitz versehene Pappe gelegt, die mit etwa 13 cm Durchmesser auf das Glasdreieck in das Lumen des Rezipienten passte. So wurde der Blumentopf mit der Pflanze unter Vermeidung von Verletzungen vorsichtig umgekehrt in das leere Glasgefäss eingesetzt. Der mit Vaseline bestrichene Schliff des Deckels schloss luftdicht ab. Nun wurde mit einer kräftig ziehenden Wasserstrahlpumpe verschieden lange Zeit (5 Minuten bis 3 Stunden) evakuiert, so dass der Druck im Inneren höchstens noch wenige mm Hg am Manometer betrug.

Durch Züchtung auf zwanzig mit Agar beschickten, grossen Kolleflaschen waren zu diesen Versuchen Massenkulturen hergestellt worden. Jede Flasche wurde mit 100 bis 120 ccm physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen; die so erhaltene Suspension (im ganzen 2 bis 2,5 Liter) war intensiv trüb, milchig. Sie enthielt in jedem ccm mindestens 10 mg oder etwa 500 Millionen Keime.

War der Vakuumapparat von der Luft bis auf Spuren befreit, und konnte man damit rechnen, dass aus den Spaltöffnungen der Pflanze alle Luft der Interzellularen ausgetreten war, wurde die Absaugung gedrosselt, und durch einen am Boden des Gefässes angebrachten Einlauf die Bakterienaufschwemmung eingelassen. Sie füllte das Gefäss etwa 14 bis 15 cm hoch, so dass nur die unteren Teile des Pflanzenstengels nicht von der Flüssigkeit umgeben waren. Dann wurde die Luft wieder eingelassen, im Rezipienten also der normale Luftdruck wieder hergestellt, so dass die Flüssigkeit durch die Spaltöffnungen in die Interzellularen eindrang und sie fast ganz erfüllte. Danach wurde der Blumentopf unter Vermeidung von Läsionen wieder herausgenommen.

Dieser Versuch wurde dreimal an je acht Pflanzen hintereinander ausgeführt. Weil die Bakteriensuspension bei den einzelnen Experimenten während einiger Stunden wiederholt verwendet wurde, waren Kontrollen ihrer Wirksamkeit nötig. Deshalb wurden nach jedem Versuch gleich grosse Pflanzen nach Verletzung einer bei den anderen Individuen untergetaucht gewesenen Stelle infiziert. Bei allen diesen Objekten entstanden Tumoren. Sie liessen sich aber auch dann erzeugen, wenn die im Vakuumtopf behandelten Pflanzen vorher absichtlich durch Anschneiden oder Abbrechen verletzt worden waren.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der injizierten Pflanzen liess sich nachweisen, dass die Bakterien sich in den Interzellularräumen in grossen Haufen vorfanden. Oft sah es so aus, als ob sie in die Zellen eingedrungen seien; aber diese Deutung ist wegen der technischen Schwierigkeiten wohl kaum zulässig. Ueberhaupt sind diese Untersuchungen nicht leicht von ihren Fehlerquellen zu befreien. Besonders sorgfältig muss zuerst die Oberfläche

von den anhaftenden Bakterien befreit werden, damit sie nicht beim Schneiden passiv in das Innere verschleppt werden. Obwohl somit die Bakterien in grosser Zahl in die Interzellularen eingedrungen waren, entstand an den injizierten, unverletzten Pflanzen niemals eine Geschwulst.

Durch diese Versuche wird bewiesen, dass die blosse Anwesenheit von B. t. in den Interzellularen der intakten Pflanze nicht genügt, um einen Tumor zu erzeugen. Die Ansicht von *Stapp,* die er auf Grund seiner grossen Erfahrung geäussert hat, liess sich also mit der Methode der Evakuierung und nachfolgenden Einpressung einer Bakteriensuspension experimentell als richtig erweisen.

IV. Morphologie des Pflanzenkrebses.

1. Histologischer Bau.

Die Grundlage der Morphologie des Pflanzenkrebses ist die schon von verschiedenen Autoren vermutete und durch unsere Versuche bewiesene Tatsache, dass nur bei Verletzung von Zellen die Tumorentstehung möglich ist. Wir müssen uns also vorstellen, dass die normalerweise eintretende Kallusbildung unter dem Einfluss der Bakterien — nicht ihrer Stoffwechselpro-

dukte (vgl. die Versuche mit Filtraten) — so gestört und geändert wird, dass ein Tumor entsteht. Damit stimmt die Tatsache überein, dass dieses Wachstum nur von bestimmten Zellen seinen Ausgangspunkt nimmt.

Aus meinen Präparaten geht hervor, dass anscheinend nur die besonders teilungsfähigen Zellen — in erster Linie diejenigen des Cambiums, vielleicht auch des Rindenparenchyms — als Geschwulstbildner in Frage kommen. Alle Präparate zeigten im wesentlichen das gleiche Bild, wie es die beigefügte Photographie wiedergibt, auf der ein Querschnittt durch den auf Seite 13 makroskopisch abgebildeten Tumor zur Darstellung gelangt ist.

Besonders interessant war der Längsschnitt durch zwei an der Ein- und Austrittsstelle der Kanüle entstandene Tumoren. Am Einstich war das Cambium nach innen abgebogen und der Tumor nach innen ohne wesentliche äussere Geschwulst entwickelt, während umgekehrt am gegenüberliegenden Ausstich das Cambium scharf nach aussen abgebogen und der Tumor als grober Knoten entwickelt war. Im Querschnitt findet man überzählige Gefässbündel, die in den Tumoren intramedullär und intrakortikal neben dem normalen Leitbündelring erscheinen. Die markständigen sind invers orientiert, so dass das Xylem nach aussen liegt. Verständlich wird dieses Bild durch die Deformation der Cambiumlinie. Die normale Zylinderform des Cambiums schwindet nämlich, und man stellt Eindellungen und Vorwölbungen der Cambiumlinie nach innen und aussen fest, während sich ihre Zellen in starker Teilung befinden.

Nach den Beobachtungen von *Smith* kann der ganze Prozess von einer Zelle ausgehen, die anschwillt und sich sehr schnell in 4, 8, 16, 32 u. s. w. Tochterzellen teilt. Diese sind noch in die erweiterte und verdickte Membran der Mutterzelle eingeschlossen. Die Teilung dauert fort, bis eine grosse Menge kleiner Tumorzellen ohne Interzellularräume gebildet ist. Später können sich die Zellen auf das normale Mass oder noch mehr vergrössern. Das Wachstum des Tumors erfolgt durch Verwandlung der angrenzenden normalen Parenchymzellen in Tumorzellen, von denen mehr als 100 in einer einzigen Rindenzelle entstehen können. Im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung tritt eine gewisse Differenzierung auf; diese ist aber regellos und ungeordnet.

Schneidet man Tumoren durch, so zeigt sich eine Masse runder und spindelförmiger Zellen, die uni- oder multinuklear sein können; man findet bis zu 7 Kerne in einer Zelle. Die Kernteilung ist mitotisch oder amitotisch; die Kerne können in ihrem Aussehen ganz verschieden sein: stark vergrössert, gelappt, gespalten, eingeschnitten oder rissig. Die Zellen zeichnen sich meist dadurch aus, dass sie sich besonders stark färben. Ausser diesen Zellen findet man Gefässe in verschieden grosser Zahl, stets aber in völlig regelloser Anordnung und meist nicht in Verbindung stehend mit den Gefässen des Pflanzenteiles, an dem sie entstanden sind.

Die Morphologie des Pflanzenkrebses ist übrigens schon viel studiert worden, und die vertretenen Auffassungen sind wenig umstritten. *Smith, Stapp, Blumenthal und Hirschfeld, Auler, Bittmann, Magrou* und in letzter Zeit besonders *Hamdi* haben umfangreiche Beschreibungen veröffentlicht.

2. „Tumor strands".

Besondere Bedeutung wurde anfangs den zuerst von *Smith* beschriebenen tumor strands zugeschrieben. Er fand nämlich zuweilen von den Geschwülsten ausgehende Stränge von Tumorzellen und glaubte, dass es sich um ein «Wandern» der Krebszellen im Organismus handele, das zur Bildung von Metastasen Anlass geben könnte. Bei späteren Untersuchungen zeigte sich aber, dass nur junge, stark teilungsfähige Zellen, besonders des Cambiums, bisweilen solche tumor strands aussenden, die höchstens einmal zur Bildung eines Sekundärtumors in der näheren Umgebung des primären, niemals aber zur Bildung echter Metastasen führen, die in grösserer Entfernung von der Infektionsstelle auftreten. Unsere Versuche, die Bakterien mit der Spritze während mehrerer Minuten und unter hohem Druck so in den Stengel der Pflanze zu injizieren, dass an entfernter Stelle die Bildung eines Tumors erfolge, schlugen sämtlich fehl. Stets entstand nur an der Einstichstelle ein Krebs. Spontane Metastasen habe ich in Uebereinstimmung mit *Stapp, Scaglioni* u. a. nie beobachtet.

Hill hat nachgewiesen, dass sich B. t. in den Interzellularräumen der Tomate pro Minute bis zu 0,04 mm ausbreiten, d. h. wandern kann. Ob die von einigen Forschern festgestellten, von der primären Geschwulst weit entfernten sekundären Tumoren infolge einer solchen Wanderung der Bakterien entstehen, wäre noch festzustellen. Ausgeschlossen erscheint das nicht, obwohl es im Hinblick auf die negativen Resultate meiner Injektionsversuche schwer verständlich wäre. Sollten aber die sekundären Geschwülste auf diese Weise entstehen, so wären sie als sekundäre Infektionen zu bezeichnen und nicht als Metastasen, da ja in diesem Falle das Bakterium und nicht die Krebszelle wanderte.

3. Vorkommen des B. t. im Pflanzenkrebs.

Macht man Schnittpräparate durch einen an der Pflanze entstandenen Tumor, so gelingt es fast niemals, Bakterien in oder zwischen den Zellen nachzuweisen. Man kann, um ein klareres Bild zu erhalten, die Besichtigung im Dunkelfeld vornehmen, eine Färbung mit dünner Fuchsinlösung oder auch eine Vergoldungsmethode anwenden. Weil es trotzdem nur ganz selten möglich war, in den Randpartien Bakterien zu finden, und die meisten Autoren überhaupt nur negative Resultate zu verzeichnen hatten, kam man zu der Ansicht, dass B. t. nicht die ausschlaggebende, sondern vielleicht nur eine untergeordnete Rolle spiele.

Bei Züchtungsversuchen aus dem Pressaft von Tumoren gelang mir der Nachweis von B. t. immer dann, wenn der Krebs nicht zu alt und infolgedessen noch nicht eingetrocknet war. Meine Erfahrungen stimmen mit denen anderer Autoren überein *(Magrou, Stapp, Kauffmann* u. a.), die angeben, dass bis etwa zehn oder zwanzig Wochen nach der Infektion der bakterio-

logische Befund nahezu regelmässig positiv ist, während er z. B. bei zwei Jahre alten Geschwülsten an Pelargonium immer negativ ausfiel *(Blumenthal und Hirschfeld).*

Bloss aus dem Grunde, weil die optische Feststellung der Bakterien im Pflanzenkrebs so selten möglich ist, zu folgern, dass das B. t. in invisibler Form, als sogenanntes «Ultravirus», im Tumor vorhanden ist, erscheint mir schon deswegen nicht statthaft, weil — wie meine früheren Untersuchungen lehren — der Nachweis unsichtbarer Formen der Bakterien bisher nicht gelungen ist. Interessant sind aber die Angaben von *d'Hérelle et Peyre* sowie *Israilsky,* die in der Geschwulst ein wirksames bakteriophages Lysin nachweisen konnten, was auf die Möglichkeit eines Antagonismus hinweist.

4. Wirkungen des B. t. im Pflanzenkrebs.

Wie hat man sich nun die Wirkung des B. t. vorzustellen, das ja nach den vorhergehenden Ausführungen die notwendige Bedingung ist für die Entstehung eines Pflanzenkrebses? Diese Frage ist in sehr verschiedener Form beantwortet worden, ohne dass bisher eine wirklich befriedigende Lösung gefunden werden konnte.

Scaglioni, der im Tumor keine Bakterien fand, meint, dass B. t. nur den Anstoss zur Krebsentstehung gibt. Ganz ähnlich äussert sich *Jensen,* der eine einmalige Anregung zu autonomem Wachstum der Zellen für ausreichend erachtet. Eine wesentlich andere Ansicht wird von *Magrou* vertreten, der eine «Fernwirkung» der Bakterien, etwa im Sinne eines Toxins, annimmt. Auch *Hamdi* spricht von einem durch die Parasiten verursachten, dauernden Reiz.

Eine zwischen beiden Extremen vermittelnde Stellung nimmt die Auffassung von *Smith* ein, die interessant und originell, aber ebenfalls unbewiesen ist. Er gibt folgende Deutung für die Wirksamkeit des B. t.: Der Erreger vermehrt sich nach seinem Eintritt in die verletzte Zelle beträchtlich. Die reichlich erzeugten Stoffwechselprodukte — es wurden Ameisen- und Essigsäure, Alkohole, Aldehyde und Ammoniak in Kulturen und Tumoren nachgewiesen — sollen das weitere Wachstum der Mikroorganismen verhindern, indem sie dieselben zur Bildung von teratologischen Formen zwingen und das Absterben eines Teiles derselben bedingen. Dadurch soll die Membran der getöteten Bakterienzelle durchlässig werden, und die bakteriellen Endotoxine in die Zelle hinaus diffundieren lassen. Der Zellkern soll hierauf unter dem Reiz der Säuren oder der genannten Endotoxine, oder vielleicht auch infolge Ueberschusses an Kohlensäure, die durch die Bakterien erzeugt wurde, in Teilung eintreten. Die aus den Mutterzellen in die Tochterzellen getragenen, mehr oder weniger gelähmten Bakterien sollen in diesen, wahrscheinlich durch den sich bei der Teilung in die Zellen ergiessenden Zellkernsaft, zu neuem Wachstum angeregt werden; die eben beschriebenen Erscheinungen sollen sich dort wiederholen. Auf diese Weise soll sich manchmal in wenigen Wochen ein enormer Ueberschuss an Tumorgewebe bilden.

Aus dieser rein deduktiven Konstruktion, bei der eine unbewiesene Annahme auf die andere gesetzt wird, ersieht man nur soviel, dass sich *Smiths* Auffasssung an die Versuche anlehnt, mit chemischen Substanzen Tumoren zu erzeugen. Dabei darf aber nicht ausser Acht gelassen werden, dass beim Bakterienkrebs die Reize nicht diskontinuierlich, sondern während langer Zeit und dauernd wirksam sind.

Im Zusammenhang mit dem Pflanzenkrebs wurde von *Blumenthal und Meyer* über Tumoren berichtet, die durch Acidum lacticum an Mohrrübenscheiben erzeugt wurden, ferner von *Bittmann und Auler* über chemische (Ameisensäure, Formamid) Erzeugung atypischer Zellteilungen. Die Annahme dieser Autoren, dass es sich dabei wegen des morphologisch ähnlichen Aufbaues um ein Analogon zur Tumefaciensgeschwulst handeln könne, wurde von *Rehwald* offenbar widerlegt, der feststellte, dass durch Chemikalien an Möhrenscheiben keine anderen Wucherungen erzeugt werden können, als durch mechanische Reize.

V. Transplantation von Pflanzenkrebsen.

Ein wichtiges, von verschiedenen Untersuchern angewendetes Mittel zur Erforschung der Pathogenese der Pflanzenkrebse ist die Transplantation der Tumoren auf gesunde Individuen. Während *Scaglioni* nur über negative Versuche berichtet, konnte in anderen Fällen eine erfolgreiche Uebertragung beobachtet werden. Naturgemäss hängt der Ausfall solcher Versuche weitgehend von dem Alter oder Entwicklungsstadium der Tumoren ab und ausserdem von dem Objekt, an dem gearbeitet wird. Die Transplantation gelang *Levine* mit Geschwülsten, in denen lebende und vermehrungsfähige Bakterien nachzuweisen waren. Bildete sich an der neuen Pflanze ein Tumor, so liess sich feststellen, dass er nicht vom implantierten Stück, sondern infolge der Bakterienwirkung und des gesetzten Traumas von den Zellen des neuen Wirtes, der sogenannten «Unterlage» ausging. Die umgekehrte Auffassung hat *Jensen* vertreten, der in seinen Transplantaten keine Parasiten nachweisen konnte und daher ein «autonomes» Wachstum der eingeimpften Krebszellen annimmt.

Eine endgültige Abklärung der Verhältnisse bei der Transplantation ist bisher nicht gelungen; diese Frage hängt eng mit der anderen zusammen, wie man sich das Verhalten und die Wirkung der Bakterien im Pflanzenkrebs vorzustellen hat.

VI. Wesen, Bedeutung und Bekämpfung des Pflanzenkrebses.

Berücksichtigt man, dass neben B. t. das Trauma eine conditio sine qua non ist, so kann es nicht überraschen, dass manche Forscher nur von einer abnormen, d. h. von einer in falsche Bahnen geleiteten Kallusbildung sprechen. *Hamdi* bezeichnet die Tumoren als Wachstumsmissbildung. *Kauffmann* nimmt ein infektiöses Granulom an und nach der Auffassung von *Blumenthal und Hirschfeld* handelt es sich beim Pflanzenkrebs um eine parasitäre Geschwulst.

1. Wesen des Pflanzenkrebses.

Wenn man auf dem Standpunkt steht, dass die Zellen autonom wachsen *(Jensen, Scaglioni),* kann der Tumor nur als echter Krebs gedeutet werden. Da er gewöhnlich — nur einmal ist *Smith* der Nachweis gelungen, dass der Tumor aus einer Epidermiszelle entstanden ist — von den Cambium- oder Rindenparenchymzellen ausgeht, die den Bindegewebszellen des tierischen Organismus vergleichbar sind, müsste man analog von Sarkom sprechen. Dagegen hat sich aber ein so erfahrener Autor wie *Stapp* gewendet, einfach aus dem Grunde, weil wir in der Deutung der Natur des Pflanzenkrebses noch nicht klar genug sehen und daher vorläufig auf eine Deutung verzichten müssen.

2. Einfluss des Tumors auf die Wirtspflanze.

Der Wasserstoffexponent in den Tumoren ist kleiner als im umgebenden Gewebe *(Soru),* die Reaktion also alkalischer. Daraus darf geschlossen werden, dass B. t. wenig Säure bildet *(Israilsky),* was mit dem kulturellen Verhalten übereinstimmt.

Metastasen sind, wie bereits gesagt wurde, noch nicht einwandfrei nachgewiesen worden.Auch von einer allgemeinen Kachexie der Pflanzen kann kaum gesprochen werden, denn der Tumor bringt seinen Wirt nur selten zum Absterben, wie auch wir an infizierten Pelargonien trotz riesiger Tumoren beobachten konnten. Ja, nach unseren Erfahrungen kommt es nicht selten vor, dass der Krebs an der wachsenden Pflanze eintrocknet und in toto abfällt, bezw. abgestossen wird.

Es besteht aber zwischen Wirt und Geschwulst eine enge Wechselbeziehung, denn die Blätter infizierter Exemplare sind kleiner, d. h. weniger entwickelt als die gesunder *(Levine).* Wenn besonders günstige Ernährungsbedingungen zur Verfügung stehen, wächst nicht nur die Pflanze, sondern auch der Tumor besser, und bei ungünstigen Verhältnissen wachsen beide schlechter. In neuen Untersuchungen fanden *Stapp und Bortels,* dass bei krebskranken Pflanzen, deren junge Sprosse regelmässig entfernt werden, die Geschwülste grösser wurden. Sie stellten ferner fest, «dass das Blühen und Fruchten der geimpften Pflanze die Tumorbildung hemmt und auch die Gestalt des entstandenen Tumors weitgehend beeinflusst».

Durch diese Feststellungen ist also bewiesen, dass die Tumoren ihren Wirten viele Nährstoffe entziehen und sie dadurch schädigen. In seltenen Fällen kann die Pflanze auch durch den Tumor zum Absterben gebracht werden; dafür ist namentlich das Alter des Wirtes zur Zeit der Infektion und auch der Sitz des Tumors massgebend.

3. Prophylaxe des Pflanzenkrebses.

Aus den genannten Gründen hat die Erkrankung an Tumefacienskrebs, die namentlich unter Obstkulturen in manchen Gegenden weit verbreitet ist, ein grosses praktisches wirtschaftliches Interesse. Die biologische Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem hat daher ein Flugblatt herausgegeben, in dem zur Bekämpfung der Krankheit Anleitungen gegeben werden. Therapeutische Massnahmen treten gegenüber prophylaktischen ganz zurück. Von diesen ist besonders die Desinfektion des Erdbodens, in dem B. t. oft vorkommt und lange lebensfähig ist, hervorzuheben. Werden nämlich Obstbäume oder andere Pflanzen in infizierte Erde eingesetzt, wobei Verletzungen der Wurzel oder der Stammbasis kaum zu vermeiden sind, so tritt bei ihnen der vom Landwirt und Gärtner so gefürchtete «Wurzelkropf» auf, der Siechtum und erhebliche Verringerung des Ertrages verursacht. Solche Bäumchen sind wegen der Gefahr der Verbreitung der Erkrankung am besten zu verbrennen.

Einzig dastehend ist eine Mitteilung von *Gosset, Gutmann, Lakhovsky et Magrou* aus dem Jahre 1924: Essais de thérapeutique du «cancer expérimental des plantes». In dieser Arbeit wird als therapeutisches Mittel der «Radio-Cellulo-Oscillateur Georges Lakhovsky» empfohlen, mit dessen Hilfe der Pflanzenkrebs heilbar sein soll. 1928 berichtete dann *Lakhovsky*, dass die mit dem Apparat behandelten krebskranken Pelargonien gut gediehen seien, während unbestrahlte, mit B. t. geimpfte Kontrollpflanzen abstarben.

In Gemeinschaft mit Herrn Prof. *Hunziker* habe ich eine Nachprüfung dieser Angaben vorgenommen. Wir liessen uns mit Hartgummi isolierte Kupferringe anfertigen und legten sie um die mit B. t. infizierten Pelargonien der ersten Serie. Bei dieser und einer zur Kontrolle geimpften Serie entwikkelten sich regelmässig Tumoren. Bisher sahen wir keinen Einfluss der «ondes magnétiques de grande fréquence»; allerdings ist die inzwischen verstrichene Zeit (etwa ein Jahr) vielleicht zu kurz, als dass ein abschliessendes Urteil gefällt werden könnte.

4. Beziehungen zum Krebs des Menschen.

Da manche Forscher die Ansicht vertreten haben, dass auch der menschliche und tierische Krebs durch B. t. hervorgerufen werde, hofften sie, mit den Erfahrungen, die bei der Bekämpfung der experimentellen Pflanzenkrebse gemacht wurden, neue Anhaltspunkte für die Bekämpfung der Krebskrankheit zu gewinnen. Diese Hoffnung hat sich jedoch als nicht berechtigt erwiesen, weil die überwiegende Mehrzahl der Tatsachen dafür spricht, dass die Aetiologie des menschlichen und tierischen Krebses von derjenigen des durch B. t. hervorgerufenen Pflanzenkrebses prinzipiell verschieden ist.

Stapp gibt zwar eine Definition des Krebses unter Einbeziehung der Pflanzengeschwulst, hält letztere aber nicht für identisch mit dem Krebs der Tiere und Menschen, denn manches — z. B. das Fehlen der Metastasen, die Vaskularisation u. s. w. — spricht gegen eine Uebereinstimmung von Pflan-

zen-, Tier- und Menschenkrebs. Er hebt aber hervor, dass andererseits auch viele Parallelen bestehen, und zählt folgende übereinstimmende Erscheinungen auf:

1. Die Malignität, denn auch der Pflanzenkrebs ist dem Wirt schädlich,
2. das funktionslose Wachstum der Geschwülste,
3. die atypische Anordnung der Krebsgewebe,
4. die auffallende Hyperplasie,
5. die ungenügende Vaskularisation,
6. der Rückgang nach dem Herausschneiden,
7. das Verhalten nach der Transplantation, als ob die Transplantate selbst Parasiten wären,
8. der Verlust der Polarität,
9. das mangelhafte Differenzierungsvermögen und
10. die degenerativen Veränderungen innerhalb der Zelle.

Aus diesen Betrachtungen ergibt sich, dass die Ansichten über die Beziehungen von Pflanzentumor zum Krebs der Tiere und Menschen noch sehr verschieden sind. Halten wir fest, dass B. t. nicht der universelle Erreger des Krebses ist. Trotzdem wird sich die Wissenschaft vom Standpunkt des Botanikers und des Krebsforschers mit diesem Problem weiter beschäftigen müssen.

ZUSAMMENFASSUNG.

Meine experimentellen Untersuchungen über die Entstehung des durch Bacterium tumefaciens hervorgerufenen Pflanzenkrebses haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Unverletzte Helianthuskeimlinge werden trotz innigem Kontakt mit den Mikroorganismen auf festen Nährböden und in der Wasserkultur nicht infiziert. Zwei Ausnahmebefunde bei dem letztgenannten Verfahren dürften durch spontane Läsionen zu erklären sein. (S. 15.)

2. Am unverletzten Stengel junger Helianthuspflanzen kommt es, selbst wenn grosse Bakterienmengen auf die Epidermis gebracht und durch Anlegung von Klammern angepresst werden, niemals, bei leichten Epidermisdefekten nur ausnahmsweise zur Bildung eines Tumors. (S. 16.)

3. Bei tieferen, bis in die Rindenzellschichten reichenden Wunden entsteht ein Pflanzenkrebs häufig, regelmässig aber erst dann, wenn das Cambium getroffen wird. (S. 12.)

4. Trotz Auswaschen der Inhalte angeschnittener Zellen entstehen nach Auftragung von Tumefacienskulturen stets Tumoren. Im Gegensatz zu den Zellteilungshormonen (Haberlandt) werden also die für die Bakterienentwicklung günstigen Stoffe durch Waschen nicht entfernt. (S. 13.)

5. Einpressung einer Aufschwemmung von B. t. in die Interzellularen einer unverletzten Pflanze erzeugt keine Tumoren. (S. 17.)

6. Die Infektion kann somit nur nach Verletzung der Zellen, speziell derjenigen des Cambiums herbeigeführt werden, nicht aber durch noch so innige Berührung der Bakterien mit unverletzten Zellen der Epidermis und des Grundgewebes.

Die Versuche mit Filtraten von Bacterium tumefaciens (S. 7), elektiven Nährbäden (S. 6), sowie Untersuchungen über die Morphologie der Pflanzenkrebse (S. 18) und andere Fragen ergänzen die bereits vorliegenden Befunde.

LITERATURVERZEICHNIS.

Amormino, Arch. Sci, med. *52,* 481 (1928). — *Auler,* Z. Krebsforschg. *21,* 354 (1924). — ibid. 22, 393 (1925). — *Bier-Bittmann,* Z. Krebsforschg. 22, 291 (1925). — *Blumenthal, Auler und Meyer,* ibid. 21, 387 (1924). — *Blumenthal und Hirschfeld,* ibid. 18, 110 (1922). — *Blumenthal und Meyer,* ibid. *21,* 250 (1924). — *Borghi und Luzzatto,* Boll. Ist. sierot. milan. *8,* 243 (1929). — *Brooks,* Plant diseases, London 1928. — *Caspari,* Hdb. pathog. Mikroorg. *1,* 1225 (1929). — *Cavara,* Staz. sperim. agrar. ital. Modena *30,* 483 (1897). — *Dauvergne und Weil,* C. r. Soc. Biol. Paris *97,* 815 (1927). — *Friedemann,* Z. Hyg. *84,* 240 (1917). — *Friedemann, Bendix, Hassel und Magnus,* Z. Hyg. *80,* 114 (1915). — *Haberlandt,* Biol. Zbl. *42,* 145 (1922). — *Hemdi,* Z. Krebsforschg. *30,* 547 (1930). — *D'Hérelle et Peyre,* C. r. de l'acad. Sci. *185,* 227 (1927). — *Hill,* Phytopathology *18,* 553 (1928). — *Israilsky,* Zbl. Bakt. II *71,* 302 (1927). — *Jensen,* Landb. Aarskr. *1918.* — *Kauffmann,* Z. Krebsforschg. *28,* 109 (1928). — ibid. *30,* 290 (1929). — *Küster,* Pathologische Pflanzenanatomie, Jena *1925.* — Flora N. F. *20.* 179 (1926). — *Levine,* Am. J. Bot. *8,* 507 (1921). — Bull. bot. club *56,* 299 (1929). — *Lieske,* Zbl. Bakter. I Orig. *108,* 118 (1928). — *Link and Hull,* Bot. gaz. *83,* 412 (1927). — *Magrou,* Ann. Inst. Pasteur, *41,* 785 (1927). — Presse méd. *1929,* 1515. — *Muncie and Patel,* Phytopathology *20,* 289 (1930). — *Rehwald,* Z. Pflanzenkrkh. *37,* 65 (1927). — *Riker,* Phytopathology *15,* 45 (1925). — *Riker and Keitt,* Science 62, 184 (1925). — *Robinson and Walkden,* Ann. Bot. *37,* 290 (1923). — *Scaglioni,* Giorn. clin. med. *10,* 355 (1929). — *Schmidt,* Z. Hyg. *112,* 95 und *113,* 90 (1931). — *Smith,* Bacterial diseases of plants 1920. — *Smith, Brown and Townsend,* Bur. Plant. Ind. Bull. *255* (1911). — *Smith and Quirk,* Phytopathology *16,* 8 (1926). — *Smith and Townsend,* Science *25,* 671 (1907). — *Soru,* C. r. Biol. Soc. Paris *102,* 127 (1929). — *Stapp,* Ber. dtsch. botan. Gesellsch. *45,* 480 (1927). — Flugblatt Nr. 78 der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Oktober *1931.* — *Stapp und Bortels,* Z. Parasitenkd. *3,* 654 und *4,* 101 (1931). — *Wormald and Grubb,* Ann. App. Biol. *11,* 278 (1924).

CURRICULUM VITAE

Georg, Wilhelm, *Walther* Schmidt von Schleswig (Preussen) wurde am 9. März 1900 in Schleswig geboren als Sohn des 1925 verstorbenen Regierungsdirektors Oskar Schmidt und der Elise, geborene Lange, die als Witwe in Dresden lebt. Besuchte das humanistische Gymnasium in Liegnitz, Potsdam und Oppeln von 1909 bis zur Notreifeprüfung 1917. Nach Teilnahme am Weltkrieg Studium der Medizin von 1919 bis 1923 in Breslau (2 Zwischensemester), Freiburg i. B. (S. S. 1919), Kiel (W. S. 1919/20 und S. S. 1920), München (W. S. 1920/21 und S. S. 1921) und Kiel (W. S. 1921/22 bis W. S. 1922/23). Dann Studium der Naturwissenschaften in Basel vom S. S. 1928 bis S. S. 1932.

Besuchte in Basel die Vorlesungen und Uebungen der Herren Professoren *Senn, Schüepp, Vischer, Zschokke, Handschin, Portmann, Speiser, Doerr, Hunziker, Kreis, Fichter, Staehelin, Spiro, Jäger* und Dr. *Vosseler.*

Die Dissertation wurde unter der Leitung des Herrn Professor *Senn* angefertigt.

Früher bestandene Examina:

1923 medizinisches Staatsexamen in Kiel,
1924 Promotion zum Dr. med. in Kiel,
1928 Kreisarztexamen in Berlin.

Seit April 1928 Assistenzarzt am hygienischen Institut der Universität Basel (Vorsteher: Professor R. Doerr).